

11/577154

PCT/JP 2004/016285

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

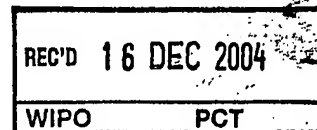
27.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2004年 9月22日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2004-274775  
[ST. 10/C]: [JP 2004-274775]



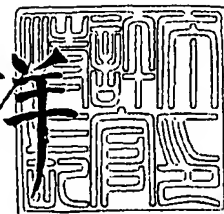
出 願 人  
Applicant(s): 帝人株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特2004-3110628

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P37983  
【提出日】 平成16年 9月22日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61L 27/00  
A61L 31/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 伊東 雅弥

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 福富 千秋

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 北薮 英一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 兼子 博章

【特許出願人】  
【識別番号】 000003001  
【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100099678  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 三原 秀子

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 206048  
【納付金額】 16,000円

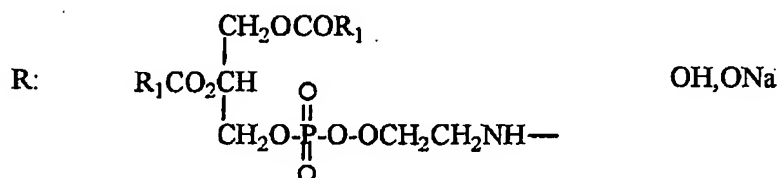
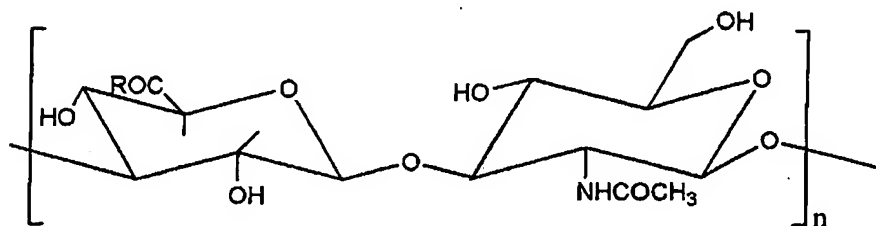
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0203001

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記式 (1)

【化 1】



..... (1)

(nは、300～30,000の整数である。RはOH, ONa、または上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub>は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10～28のアルキルもしくはアルケンを示す。)

で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であって、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1～50当量であるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料。

【請求項 2】

該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである請求項1に記載の関節軟骨治療用材料。

【請求項 3】

ハイドロゲルである請求項1または2に記載の関節軟骨治療用材料。

【書類名】明細書

【発明の名称】関節軟骨治療用材料

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料に関する。

【背景技術】

【0002】

軟骨は生体内で数少ない無血管系の組織の1つであり、元の組織に再建することは難しいとされている。外傷による軟骨欠損や離断性骨軟骨炎など限局した軟骨病変に基づく変形性関節症の発症を抑えるため、種々の治療法が試みられてきた。

【0003】

自家軟骨細胞または骨髄細胞から間葉系幹細胞を採取して分化した軟骨細胞を、細胞のみ、あるいは培養基材(Scaffold)に培養して軟骨欠損部に移植する自家軟骨細胞移植 (Autologous Chondrocytes Implantation; ACI) が試みられている (非特許文献1,2,3)。

【0004】

また、自家軟骨細胞を生体外で培養する際に、より生体内環境に近いとされる3次元培養が積極的に試みられており、培養基材としては、コラーゲン、アルギン酸、フィブリンなど体内で安全と認められている材料が用いられている。そのうちコラーゲンについては、アテロコラーゲンをを用いた手法を越智らが開発し、臨床試験が始まっている (特許文献1)。しかし、コラーゲンは生体吸収性は示すものの、抗原性を完全に除去することは困難であり、また未知のウイルス感染などの危険性を否定することが出来ないなどの課題がある。

【0005】

これに対し、ヒアルロン酸は関節軟骨を形成する細胞外基質の構成成分であり、軟骨との親和性が高い。さらにヒアルロン酸は動物由来の原料を含まない発酵法で生成することが可能であるため、コラーゲンとは異なり未知のウイルス感染などの危険性は低い。そこで最近では、再生医療においてヒアルロン酸を利用した膝軟骨損傷治療の検討が行われている。例えば、ベンジルエステル化ヒアルロン酸 (特許文献2、非特許文献4,5,6)、ビスエポキシド架橋ヒアルロン酸 (特許文献3)、ジビニルスルホン架橋ヒアルロン酸 (特許文献4,5)、ホルムアルデヒド架橋ヒアルロン酸 (特許文献6)、ヒドラジド架橋ヒアルロン酸などが挙げられる。

【0006】

しかし、いずれの場合もヒアルロン酸の生体吸収性を改善するために架橋剤を使用しているが、これらの架橋剤が非生体吸収性物質であるため安全性が懸念されており、安全性に優れた関節軟骨治療用材料が求められている。ちなみにここで言う“架橋”とは、共有結合からなる化学架橋以外に、静電相互作用によるイオン架橋、ファンデルワールス力、疎水性相互作用による物理架橋を指す。

【0007】

【特許文献1】特開2001-293081号公報

【特許文献2】米国特許第5939323号明細書

【特許文献3】特開平7-97401号公報

【特許文献4】米国特許第4582865号明細書

【特許文献5】米国特許第4605691号明細書

【特許文献6】特開昭60-130601号公報

【非特許文献1】N Engl J Med. 331, 889-95(1994)

【非特許文献2】J Bone Joint SurgAm. 76, 579-92(1994)

【非特許文献3】Artificial Organs .25, 172-179(2001)

【非特許文献4】J. Biomed. Mater. Res. 42, 172-81(1998)

【非特許文献5】J. Biomed. Mater. Res. 46, 337-46(1999)

【非特許文献 6】 J. Orthop. Res. 18, 773-780 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

軟骨基質の産生を維持でき、かつ安全性に優れた生体由来物質からなる架橋剤を使用した関節軟骨治療用材料を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

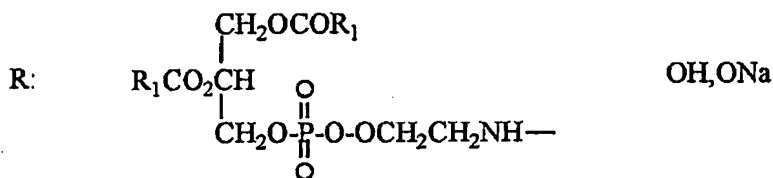
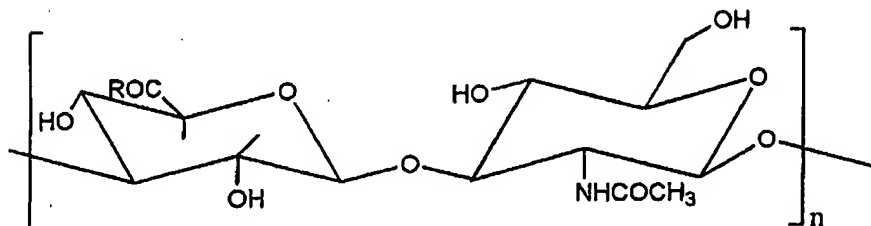
本発明の発明者は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物及びそれからなるハイドロゲルが、関節軟骨治療用材料として有用であることを見出し本発明に到達した。

【0010】

本発明は以下の通りである。

1. 下記式 (1)

【化 1】



..... (1)

(n は、300～30,000 の整数である。R は OH, ONa または上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub> は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数 10～28 のアルキルもしくはアルケンを示す。)

で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であって、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基 100 当量に対し、1～50 当量であるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料。

2. 該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである 1 記載の関節軟骨治療用材料。

3. ハイドロゲルである 1 または 2 に記載の関節軟骨治療用材料。

【発明の効果】

【0011】

本発明の関節軟骨治療用材料は軟骨基質の産生を維持でき、生体由来物質からなる架橋剤を使用しており安全性に優れている。また正常部との結合や組織の連続性が良好であり、良好な修復能を有することから、再生医療における関節軟骨治療用材料として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明について詳述する。なお、これらの実施例等および説明は本発明を例示す

るものであり、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨に合致する限り他の実施の形態も本発明の範疇に属し得ることは言うまでもない。

#### 【0013】

本発明で使用されているヒアルロン酸は、動物組織から抽出したもの、または発酵法で製造したものどちらでも使用できる。発酵法で使用する菌株はストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産能を有する微生物であり、ストレプトコッカス・エクイFM-100(特開昭63-123392号公報)、ストレプトコッカス・エクイFM-300(特開平2-234689号公報)が挙げられる。これらの変異株を用いて培養、精製されたものを用いる。またヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ のものが好ましい。なお本発明というヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する。

#### 【0014】

本発明で使用されているホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体は、動物組織から抽出したもの、または合成して製造したものどちらでも使用できる。ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体として以下のものが挙げられる。ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン、ジベヘノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリグノセロイルホスファチジルエタノールアミン、ジセロチオイルホスファチジルエタノールアミン、ジモンタノイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジネルボノイルホスファチジルエタノールアミン、ジキメノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレノイルホスファチジルエタノールアミン、ジヒラゴノイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドノイルホスファチジルエタノールアミン、ジドコサヘキサエノイルホスファチジルエタノールアミン。その中でも、溶解性の面からジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

#### 【0015】

上記式(1)のRにおいて、R1は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10~28のアルキル基もしくはアルケニル基であるが、なかでも炭素数14~20が好ましい。

その中でも、合成する際に使用する有機溶媒への溶解性の面からジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

上記式(1)のRにおいて、nは、300~30,000であるが、なかでもnは1,000~10,000であることが好ましい。

ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体の含有量は、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1~50当量である。

#### 【0016】

本発明の関節軟骨治療用材料はヒアルロン酸の滞留性を高める目的でハイドロゲルであることが好ましく、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体の含有量が1当量より少ないとハイドロゲルを形成せず、また、50当量より多いと疎水性が高くなり不溶物が発生し、ハイドロゲルを形成しない。

#### 【実施例】

#### 【0017】

以下の実施例により本発明の詳細をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

本実施例に使用したヒアルロン酸ナトリウム、テトラヒドロフラン、0.1M HCl、0.1M NaOH、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC)、1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)、L-leucine methyl ester hydrate

ochloride、消毒用エタノール、10%中性緩衝ホルマリン溶液、サフラニンO溶液は、和光純薬工業(株)、L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(COATSOME ME-8181)は日本油脂(株)、Fast Green FCF は、Polyscience(株)、Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid, tetrasodiumsalt, tetrahydrate(以下EDTA)は同仁化学研究所(株)、ペントバルビタール(以下ネンブタール)は大日本製薬(株)、1%キシロカインはアストラゼネカ(株)、結晶ペニシリンGカリウム(以下ペニシリン)は萬有製薬(株)、ヨードチンキは吉田製薬(株)、3%アテロコラーゲンは高研(株)のものを使用した。また、本実施例に使用したニュージーランド白色家兎(以下NZWウサギ)は雄性であり、日本SLC(株)より購入して体重3.0~3.5kgになるまでゲージにて通常飼育を行った。手術時の週齢は24~28週齢であった。その他の試薬については、のものを使用した。

#### 【0018】

##### [実施例1]

##### (1) 化合物合成

L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン110mg(0.000033mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し10当量)を、テトラヒドロフラン/水=1/1(v/v)200mlに溶解した。この溶液に、ヒアルロン酸ナトリウム500mgを加え、0.1M HCl/0.1M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide(EDC) 30mg(0.000033mol)、1-hydroxybenzotriazole(HOBT) 25mg(0.000033mol)をテトラヒドロフラン/水=1/1の水溶液10mlに溶解し反応系に添加し、終夜攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。確認は<sup>1</sup>HNMR(日本電子JNM-alpha400)により行い、目的物の生成を確認した。

凍結乾燥品30mgをイオン交換水970mgに溶解し、濃度3wt%のハイドロゲルを調整した。

#### 【0019】

##### (2) 動物評価

調整したヒアルロン酸ハイドロゲルの生物学的評価を以下の方法により行った。通常飼育したNZWウサギの耳介静脈にペントバルビタールを投与し、全身麻酔下で以下の手術を施した。両側の後肢膝関節周辺部を剃毛し、エタノール消毒した後、キシロカインを局所に数回に分けて筋肉内投与した。膝関節内側を切開し、膝蓋骨を脱臼させることにより大腿骨膝蓋溝を露出させた。内側側副靱帯から5mmほど上部の滑車溝部分に、手術用ドリルで内径5mm、深さ5mmの円筒形の欠損部を作製することによって、膝関節軟骨全層を欠損させた。そこに欠損部に上記で得られたハイドロゲルを埋入したのち、膝蓋骨を元の位置に戻して筋肉を手術用縫合糸にて縫合した。感染防止のためにペニシリンを患部に滴下したのち、皮膚を縫合した。最後にヨードチンキで消毒し、ゲージに戻して通常の飼育を行った。術後8週間目に屠殺して欠損部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬、固定させ、組織学的評価に供した。固定した組織を、脱脂、EDTA脱灰した後、パラフィンに包埋し、欠損部の中心部近傍を矢状面に薄切して、標本作製した。作製した標本にサフラニンO染色を施し、以下の項目についてスコア化することにより組織学的な評価を行った。

組織学的評価に用いたスコアグレードは、Wakitani S et al., J Bone Joint Surg Am. 76, 579-92(1994)の変法であるMakino T et al., Kobe J Med Sci. 48: 97-104(2002)に従って実施した。表1に組織学的評価をする際に用いた項目と得点を示す。

#### 【0020】

【表1】

軟骨欠損に対する組織学的評価

A. 細胞の形態	4 硝子軟骨のみで構成、正常 3 大半が硝子軟骨で修復 2 線維軟骨が大半 1 ほとんどが非軟骨組織で修復 0 軟骨組織が全くない
B. サフラニンOによる基質の染色性	3 (正常部位と比較して) 同等の染色性 2 少し低下 1 かなり低下 0 染色性なし
C. 表面の形態*	3 平滑(>3/4) 2 中程度(1/2-3/4) 1 でこぼこ(1/4-1/2) 0 ひどくでこぼこ(<1/4)
D. 軟骨組織の厚さ**	2 >2/3 1 1/3-2/3 0 <1/3
E. 正常部分近傍の軟骨に対する修復部分の一体化	2 両端とも一体化 1 一端が一体化 0 両端とも一体化していない
合計 A-E	14

\* 欠損部位での全体に対する平滑な部分の割合

\*\* 修復部の正常部位と比較した平均の厚さ

## 【0021】

全体の合計は14点であり、項目によって3～5段階で評価する。組織の修復度が高いほど、すなわち、正常組織に近い修復を示すほど、14点に近づくことになる。すなわち、項目は、修復された組織の形態(0点から4点)、基質の染色性(0点から3点)、表面の状態(0点から3点)、軟骨組織の厚さ(0点から2点)、非欠損部との結合度(0点から2点)、についてであり、本法では正常組織に近いほど得点が高くなる。

## 【0022】

術後8週目に欠損部位を摘出して組織学的評価を行った結果を表2に示す。術後8週間目において修復された軟骨組織は、ほとんどが硝子軟骨様を呈しており、基質が良好に産生をしている様子が観察された。また、正常部との結合も良好であり、組織の連続性を認めた。

## 【0023】

## [比較例1]

実施例1と同様に、大腿骨滑車溝に欠損部を作製したのち、アテロコラーゲンゲル(登録商標)(I型、高研)を埋入して整復し、術後8週目に欠損部位を摘出して組織学的評価を行った結果を表2に示す。

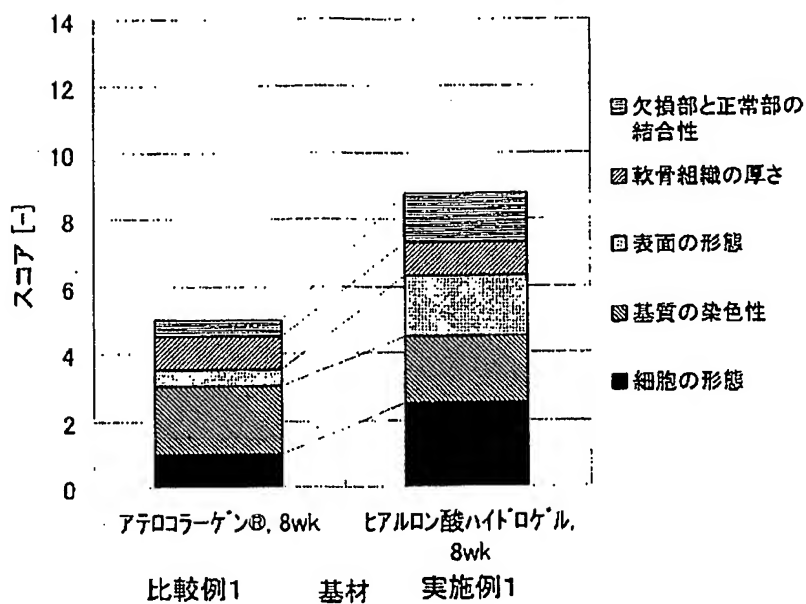
実施例1と比較すると、基質の染色性は他の条件との差が認められないものの、表面は平滑になっておらず、軟骨下骨が全く再建されていなかった。

## 【0024】



【表2】

術後8週におけるウサギ膝関節の組織学的評価



## 【0025】

以上の結果より、実施例1は、基質の染色性と修復した軟骨組織の厚さにおいては比較例1と同等であるが、表面の状態と正常組織との組織学的な連続性については正常組織により近い修復であり、全体として良好な修復能を示すことが確認できた。

## 【0026】

これより本発明のヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンジオレオイルからなるヒアルロン酸化合物は比較例（アテロコラーゲン）よりも軟骨治療用材料として優れていることが分かった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0027】

本発明の関節軟骨治療用材料は良好に軟骨基質の産生を維持でき、安全性に優れていることから、再生医療における関節軟骨治療用材料として有用である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】軟骨基質の産生を維持でき、骨分化が進行しないようにコントロールできる関節軟骨治療用材料を提供する。

【解決手段】ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料。安全性に優れていることから、再生医療における関節軟骨治療用材料として有用である。

【選択図】なし

特願2004-274775

出願人履歴情報

識別番号

[000003001]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住所

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

氏名

帝人株式会社

PCT/JP 2004/016285

11/577154

27.10.2004

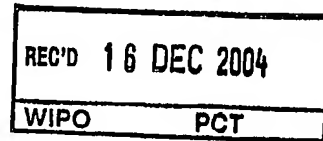
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2004年 7月13日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2004-205682  
[ST. 10/C]: [JP 2004-205682]



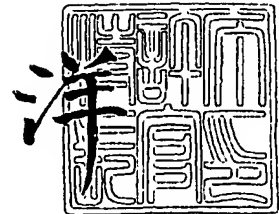
出 願 人  
Applicant(s): 帝人株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3110613

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P37890  
【提出日】 平成16年 7月13日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61L 27/00  
A61L 31/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 北薮 英一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 兼子 博章

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町3-4-9  
【氏名】 続 佐紀

【特許出願人】  
【識別番号】 000003001  
【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100099678  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 三原 秀子

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 206048  
【納付金額】 16,000円

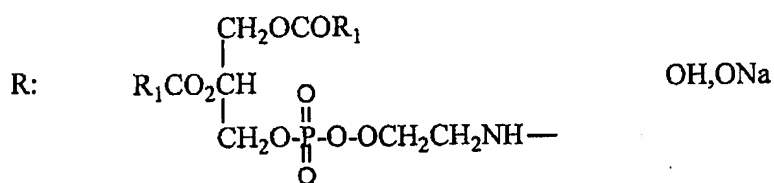
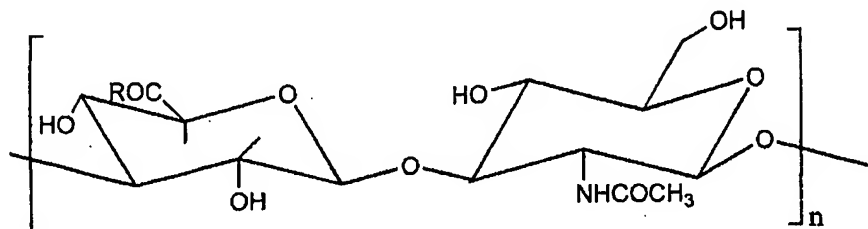
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0203001

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

下記式 (1) で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であって、

## 【化 1】



. . . . . (1)

(nは、300～30,000の整数である。RはOH, ONa、または上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub>は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10～28のアルキル基もしくはアルケニル基を示す。) ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、51～100当量であるヒアルロン酸化合物。

## 【請求項 2】

該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである請求項1記載のヒアルロン酸化合物。

## 【請求項 3】

請求項1または2記載のヒアルロン酸化合物を成型することによって得られる成型体。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】ヒアルロン酸化合物及びその成型体

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物、さらにその成型体に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒアルロン酸はその優れた保水能力、粘弾性及び高い生体親和性を示すため、膝関節機能改善剤、点眼剤等に利用されている。しかしその一方、ヒアルロン酸は生体吸収が速いという点から使用範囲が制限されているという面もある（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3）。つまり、ヒアルロン酸の水性液体に対する不溶化を検討することは非常に重要であると言える。ここで言う水性液体とは、水、生理食塩水、緩衝液およびアルコールなど有機溶媒を含有する水溶液を意味する。また不溶化とは、ある一定期間ヒアルロン酸が体内に滞留し、その後は徐々に分解が進み、最終的には生体吸収されることを意味する。そこでこれらの課題を解決するために、これまで様々なヒアルロン酸誘導体が合成されている。例えば、ベンジルエステル化ヒアルロン酸（特許文献1、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3）、また、ビスエポキシド（特許文献2）、ジビニルスルホン（特許文献3、特許文献4）、ホルムアルデヒド（特許文献5）、ヒドラジドで架橋されたヒアルロン酸誘導体が挙げられる。しかし、これらの誘導体を合成するのに用いる化合物はいずれも非天然物質であり、生体に対する毒性及び炎症性が懸念される。

## 【0003】

【特許文献1】米国特許第5939323号明細書

【特許文献2】特開平7-97401号公報

【特許文献3】米国特許第4582865号明細書

【特許文献4】米国特許第4605691号明細書

【特許文献5】特開昭60-130601号公報

【非特許文献1】J. Biomed. Mater. Res. 42:2, 172-81 (1998)

【非特許文献2】J. Biomed. Mater. Res. 46:3, 337-346 (1999)

【非特許文献3】J. Ortho. Res. 18:5, 773-380 (2000)

## 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

生体に適用した場合においても安全で、また水性液体に対して不溶性を示すヒアルロン酸化合物を提供する。

【課題を解決するための手段】

## 【0005】

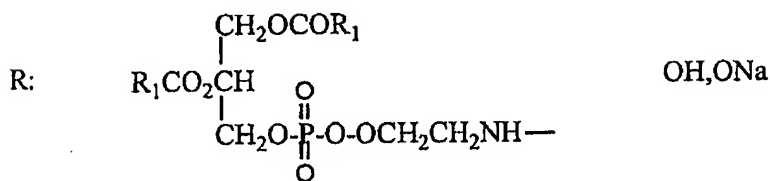
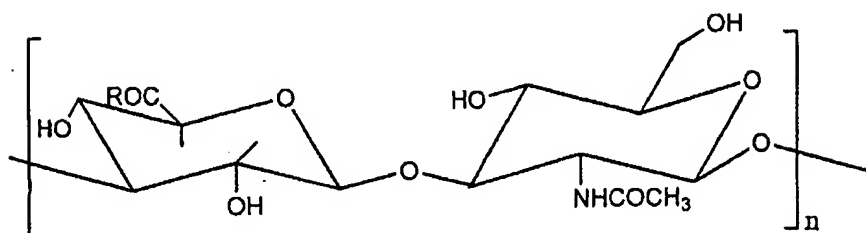
本発明の発明者は、生体由来物質でありかつ安全性に優れたホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ヒアルロン酸の水性液体に対する不溶化に有効であることを見出し本発明に到達した。

## 【0006】

本発明は以下の通りである。

1. 下記一般式(1)で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であって、

## 【化1】



. . . . . (1)

(nは、300～30,000の整数である。RはOH, ONaまたは上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub>は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10～28のアルキル基もしくはアルケニル基を示す。)

ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、51～100当量であるヒアルロン酸化合物。

2. 該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンである1記載のヒアルロン酸化合物。

3. 1または2記載のヒアルロン酸化合物を成型することによって得られる成型体。

## 【発明の効果】

## 【0007】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物、さらにその成型体に関する。このヒアルロン酸化合物は水性液体に対し不溶性を示し、関節軟骨治療用材料、癒着防止材、皮膚の保湿材料などに有用であると考えられる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0008】

以下、本発明について詳述する。なお、これらの実施例等および説明は本発明を例示するものであり、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨に合致する限り他の実施の形態も本発明の範疇に属し得ることは言うまでもない。

## 【0009】

本発明で使用されているヒアルロン酸は、動物組織から抽出したもの、または発酵法で製造したもののどちらでも使用できる。発酵法で使用する菌株はストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産能を有する微生物であり、ストレプトコッカス・エクイFM-100(特開昭63-123392号公報)、ストレプトコッカス・エクイFM-300(特開平2-234689号公報)が挙げられる。これらの変異株を用いて培養、精製されたものを用いることができる。またヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ のものが好ましい。なお本発明でいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する。

## 【0010】

本発明で使用されているホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体は、動物組織から抽出したもの、または合成して製造したもののどちらでも使用できる。ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体として以下のものが挙げられる。ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミト



イルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン、ジベヘノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリグノセロイルホスファチジルエタノールアミン、ジセロチオイルホスファチジルエタノールアミン、ジモンタノイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジネルボノイルホスファチジルエタノールアミン、ジキメノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレノイルホスファチジルエタノールアミン、ジヒラゴノイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドノイルホスファチジルエタノールアミン、ジドコサヘキサエノイルホスファチジルエタノールアミン。

#### 【0011】

上記式(1)のRにおいて、R1は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10~28のアルキル基もしくはアルケニル基であるが、なかでも炭素数14~20が好ましい。

その中でも、合成する際に使用する有機溶媒への溶解性の面からジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

上記式(1)のRにおいて、nは、300~30,000であるが、なかでもnは1,000~10,000が好ましい。

#### 【0012】

ホスファチジルエタノールアミンの含有量及びその誘導体は、水性液体に対し十分な不溶性を示すためには、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、51~100当量である。

#### 【0013】

本発明でいう成型体とは、多孔体(スポンジ)、不織布、フィルムなどを挙げることができる。

本発明に用いる成型体を製造する方法としては、先述の特性を満たす成型体を得られる手法であれば特に限定されないが、凍結乾燥法、乾式製膜、湿式製膜、凝固紡糸、スパンボンド法、メルトブロー法、フラッシュ紡糸法などが挙げられる。

#### 【実施例】

##### 【0014】

以下の実施例により本発明の詳細をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

本実施例に使用したヒアルロン酸ナトリウムはストレプトコッカス属由来の平均分子量が1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムであり、これはn=3,500に相当する。その他の試薬については、テトラヒドロフラン、0.1M HCl、0.1M NaOH、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC)、1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)、L-leucine methyl ester hydrochloride、リン酸緩衝生理食塩水は、和光純薬工業(株)、L- $\alpha$ -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(COATSOME ME-8181)は日本油脂(株)、のものを使用した。

##### 【0015】

##### [実施例1]

ヒアルロン酸ナトリウム100mgをテトラヒドロフラン/水=1/1(v/v)の水溶液40mlに溶解した。この溶液に、L- $\alpha$ -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン154mg(0.00021mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し70当量)を加え、0.1M HCl/0.1M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 42mg(0.000231mol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 35mg(0.000231mol)

をテトラヒドロフラン/水=1/1(v/v)10mlに溶解し反応系に添加した。その際0.1M NaOHを加え反応系をpH 6.8に保持した。その後終夜攪拌を行い、攪拌後透析を3日間行い凍結乾燥し目的物(スポンジ)を得た。確認は<sup>1</sup>H NMR(日本電子JNM-alpha 400)により行い、目的物の生成を確認した。

## 【0016】

以下の方法により溶解性テストを行った。得られた目的物20mgをリン酸緩衝生理食塩水5ml中に浸漬し、室温静置状態での溶解性について4週間テストを行い、目視で確認を行った。溶解性テストの結果を表1に示す。

## 【0017】

## [実施例2]

L-α-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン223mg(0.0003mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し100当量)、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide(EDC)60mg(0.00033mol) 1-hydroxybenzo-triazole(HOBT)50mg(0.00033mol)とした以外は、実施例1と同様に目的物(スポンジ)を得た。溶解性テストの結果を表1に示す。

## 【0018】

## [比較例1]

ヒアルロン酸ナトリウム20mgをリン酸緩衝生理食塩水5ml中に浸漬し、室温静置状態での溶解性について4週間テストを行い、目視で確認を行った。結果を表1に示す。

## 【0019】

## [比較例2]

L-α-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン66mg(0.00009mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し30当量)、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide(EDC)18mg(0.000099mol) 1-hydroxybenzo-triazole(HOBT)15mg(0.000099mol)とした以外は、実施例1と同様に成形体を得た。溶解性テストの結果を表1に示す。

## 【0020】

## 【表1】

表1. ヒアルロン酸化合物の溶解性テスト結果

	L-α-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンの含有量(当量) <sup>1)</sup>	1 day	1 weeks	2 weeks	4 weeks
実施例1	70	○	○	○	○
" 2	100	○	○	○	○
比較例1	0	×	×	×	×
" 2	30	△	×	×	×

○: 溶解していない、△: 一部溶解、×: 完全溶解

1) ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対する量

## 【0021】

表1より、ヒアルロン酸-L-α-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(含有量: 70、100当量)は、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸-L-α-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(含有量: 30当量)と比較し、水性液体に対するヒアルロン酸の不溶化が進んでいることが明らかである。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0022】

上記ヒアルロン酸化合物は、ヒアルロン酸の滞留性を高めることが重要と思われる用途、具体的には関節軟骨治療用の材料、癒着防止材、皮膚の保湿材料などに有用であると考

えられる。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】生体に適用した場合においても安全で、また水性液体に対して不溶性を示すヒアルロン酸化合物を提供する。

【解決手段】ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であってホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、51～100当量であるヒアルロン酸化合物

。

【選択図】なし

特願 2004-205682

出願人履歴情報

識別番号

[000003001]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住所

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

氏名

帝人株式会社

PCT/JP 2004/016285

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.10.2004

REC'D 16 DEC 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 0 月 2 9 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 6 8 5 4 0  
Application Number:

[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 6 8 5 4 0 ]

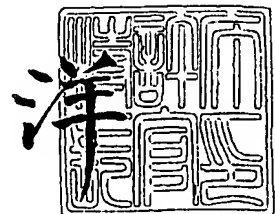
出 願 人                      帝 人 株 式 会 社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月    2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 9 8 7 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P37048  
【提出日】 平成15年10月29日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C08B 37/08  
A61L 27/00  
A61L 31/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 北薊 英一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 兼子 博章

【特許出願人】  
【識別番号】 000003001  
【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100099678  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 三原 秀子

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 206048  
【納付金額】 21,000円

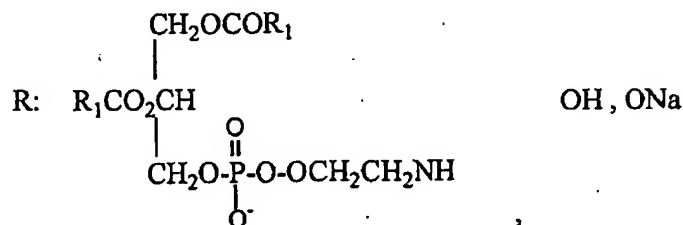
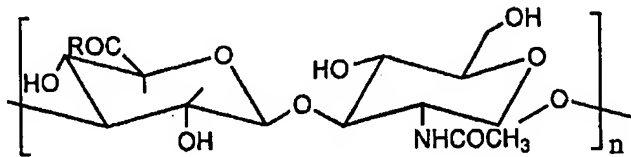
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0203001

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

下記一般式 (1) で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなる化合物であって、

【化 1】



..... (1)

(n は、300～30,000 の整数である。R は OH, ONa または上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub> は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数 12～28 のアルキルもしくはアルケンを示す。)

ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基 100 当量に対し、1～50 当量であるヒアルロン酸化合物。

【請求項 2】

該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである請求項 1 記載のヒアルロン酸化合物。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載のヒアルロン酸化合物からなるハイドロゲル。



【書類名】明細書

【発明の名称】高弾性ヒアルロン酸ハイドロゲル

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなるヒアルロン酸化合物及びそれからなるハイドロゲルに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒアルロン酸はその優れた保水能力や粘弾性及び高い生体親和性を示すため、バイオマテリアルとして広く利用されている。最近では、再生医療において膝軟骨損傷治療用の材料として検討がなされている。

(1) 不溶性ベンジルエステル化ヒアルロン酸を用いた細胞培養基材が知られている(特許文献1、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)が、膝軟骨の様に荷重のかかる部位においては、ヒアルロン酸は明らかに強度不足であり、この問題を解決するために架橋ヒアルロン酸の検討がなされている。

【0003】

しかし従来知られている架橋剤は、ビスエポキシド(特許文献2)、ジビニルスルホン(特許文献3、特許文献4)、ホルムアルデヒド(特許文献5)、ヒドラジドなどであり、生体に適用した時には安全性に不安がある。また化学反応を伴うために、副生成物の安全性の問題も考えられる。そのため化学反応を伴わない架橋方法、つまり水素結合、疎水性相互作用などを利用した物理架橋が求められているが、有効な手段が無いのが現状である。

【0004】

【特許文献1】米国特許第5939323号明細書

【特許文献2】特開平7-97401号公報

【特許文献3】米国特許第4582865号明細書

【特許文献4】米国特許第4605691号明細書

【特許文献5】特開昭60-130601号公報

【非特許文献1】J. Biomed. Mater. Res. 42:2, 172-81 (1998)

【非特許文献2】J. Biomed. Mater. Res. 46:3, 337-346 (1999)

【非特許文献3】J. Ortho. Res. 18:5, 773-380 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

膝軟骨の様に荷重のかかる部位においても使用可能な十分な強度を有し、生体に適用した場合においても安全なヒアルロン酸架橋物とそのハイドロゲルを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

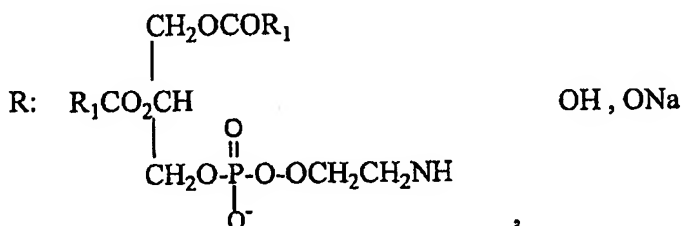
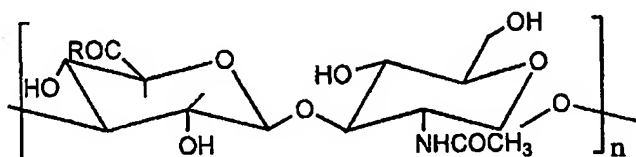
本発明の発明者は、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が生体に安全な物質でありかつヒアルロン酸の架橋に有効であることに着目し、ヒアルロン酸をホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体を用いて水素結合、疎水性相互作用などを利用した物理架橋することで得られるヒアルロン酸化合物および該化合物からなるヒアルロン酸ハイドロゲルが、膝軟骨の様に荷重のかかる部位においても使用可能な十分な強度を有する材料であることを見出し本発明に到達した。

【0007】

本発明は以下の通りである。

1. 下記一般式(1)で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなる化合物であって、

## 【化1】



..... (1)

(nは、300～3,000の整数である。RはOH, ONaまたは上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub>は夫々同時または別個に、置換または無置換の炭素数12～28のアルキルもしくはアルケンを示す。)

上記ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1～50当量であるヒアルロン酸化合物。

2. 該ホスファチジルエタノールアミン誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである1に記載のヒアルロン酸化合物。

3. 1及び2に記載のヒアルロン酸ハイドロゲル。

## 【発明の効果】

## 【0008】

本発明は、ヒアルロン酸とびホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなるヒアルロン酸化合物及びそのハイドロゲルに関する。このヒアルロン酸ハイドロゲルは高弾性を有し、再生医療における膝軟骨損傷治療用の材料として有用である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

以下、本発明について詳述する。なお、これらの実施例等および説明は本発明を例示するものであり、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨に合致する限り他の実施の形態も本発明の範疇に属し得ることは言うまでもない。

## 【0010】

本発明で使用されているヒアルロン酸は、動物組織から抽出したもの、または発酵法で製造したものどちらでも使用できる。発酵法で使用する菌株はストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産能を有する微生物であり、ストレプトコッカス・エクイFM-100(特開昭63-123392号公報)、ストレプトコッカス・エクイFM-300(特開平2-234689号公報)が挙げられる。これらの変異株を用いて培養、精製されたものを用いる。またヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ のものが好ましい。なお本発明でいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する。

## 【0011】

本発明で使用されているホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体は、動物組織から抽出したもの、または合成して製造したものどちらでも使用できる。ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体として以下のものが挙げられる。ジラウリルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアリルホスファチジルエタノールアミン、ジ

オレイルホスファチジルエタノールアミン、ジエイコシルホスファチジルエタノールアミン、ジドコシルホスファチジルエタノールアミン、ジテトラコシルホスファチジルエタノールアミン、ジヘキサコシルホスファチジルエタノールアミン、ジオクタコシルホスファチジルエタノールアミン。

その中でも、溶解性の面からジオレイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

#### 【0012】

ホスファチジルエタノールアミンの含有量は、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1~50当量であることが好ましい。1当量より少ないとハイドロゲルを形成しない。また、50当量より多いと疎水性が高くなり不溶物が発生し、ハイドロゲルを形成しない。

#### 【実施例】

#### 【0013】

以下の実施例により本発明の詳細をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【0014】

本実施例に使用したヒアルロン酸ナトリウムはストレプトコッカス属由来の平均分子量が1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムであり、これは $n=3,500$ に相当する。その他の試薬については、テトラヒドロフラン、0.1M HCl、0.1M NaOH、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC)、1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)、L-leucine methyl ester hydrochlorideは、和光純薬工業(株)、L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(COATSOME ME-8181)は日本油脂(株)、3%アテロコラーゲンは高研(株)のものを使用した。

#### 【0015】

#### 【実施例1】

L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン110mg(0.000033mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し10当量)を、テトラヒドロフラン/水=1/1(v/v)200mlに溶解した。この溶液に、ヒアルロン酸ナトリウム500mgを加え、0.1M HCl/0.1M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 30mg(0.000033mol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 25mg(0.000033mol)をテトラヒドロフラン/水=1/1の水溶液10mlに溶解し反応系に添加し、終夜攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。確認は<sup>1</sup>H NMR(日本電子JNM-alpha400)により行い、目的物の生成を確認した。

#### 【0016】

凍結乾燥品30mgをイオン交換水970mgに溶解し、濃度3wt%のハイドロゲルを調整した。このハイドロゲルの複素弾性率及びズリ降伏応力を調べるために、Rheometer RFIII、SRV(TA Instrument)を使用し、37℃で測定を行った。その結果を表1に示す。ここでいう、複素弾性率とは弾性体の応力とひずみの比を表す定数であり、ズリ降伏応力とはズリ応力を懸けた際、ゲルの構造が維持される最大応力を示す。

#### 【0017】

#### 【実施例2】

L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン440mg(0.00012mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し40当量)、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 120mg(0.000132mol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 100mg(0.000132mol)とした以外は、実施例1と同様

。結果を表1に示す。

【0018】

[比較例1]

ヒアルロン酸ナトリウム50mgにイオン交換水5mlを加え攪拌を行い、ハイドロゲルを得た。物性評価については、実施例1と同様。結果を表1に示す。

【0019】

[比較例2]

米国特許第4,937,270号明細書を参考に追試実験を行った。詳細は以下の通りである。

ヒアルロン酸ナトリウム400mgを水40mlに溶解し、0.1M HClによりpHを4.75に調整した。

【0020】

1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 153mg(0.80mmol)、L-leucine methyl ester hydrochloride 182mg(1.0mmol)を添加し、5時間攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。物性評価については、実施例1と同様。結果を表1に示す。

【0021】

[比較例3]

アテロコラーゲンを使用した以外は、実施例1と同様の条件でアテロコラーゲンを測定した。結果を表1に示す。

【0022】

【表1】

各種ハイドロゲルの物性値

	材料	複素弾性率(Pa)	ズリ降伏応力(Pa)
実施例1	ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレイル ホスファチジルエタノールアミン(1 0mol%)	421	1,083
実施例2	ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレイル ホスファチジルエタノールアミン(4 0mol%)	902	1,734
比較例1	ヒアルロン酸ナトリウム	5	18
比較例2	架橋ヒアルロン酸	513	515
比較例3	アテロコラーゲン	293	919

【0023】

表1より、ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミンは、ヒアルロン酸ナトリウム、アテロコラーゲンと比較し複素弾性率、降伏ズリ応力いずれも優れていることが明らかである。また、架橋ヒアルロン酸と比較した場合においても、同等またはそれ以上の機械特性を示すことが分かる。

【0024】

本発明で得られたヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンおよびその誘導体からなる高弾性ヒアルロン酸ハイドロゲルの弾性率は、200Pa以上であり200Pa以下では膝関節部位に注入した際、形状を維持することが困難であることから膝軟骨損傷治療用の材料として有用であることが判る。

【産業上の利用可能性】

【0025】

上記高弾性ヒアルロン酸ハイドロゲルは、再生医療における膝軟骨損傷治療用の材料として有用である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 膝軟骨の様に荷重のかかる部位においても使用可能な十分な強度を有し、生体に適用した場合においても安全なヒアルロン酸架橋物とそのハイドロゲルを提供する。

【解決手段】 特定の分子量を有するヒアルロン酸と特定の構造を有するホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなる化合物と当該化合物からなるハイドロゲルは、高い複素弾性率と降伏ズリ応力を有するので当該高弾性ハイドロゲルを膝軟骨損傷治療用の材料として提供する。

【選択図】 なし

特願2003-368540

出願人履歴情報

識別番号

[000003001]

1. 変更年月日  
[変更理由]

1990年 8月28日

新規登録

住所  
氏名

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号  
帝人株式会社

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005年5月6日 (06.05.2005)

PCT

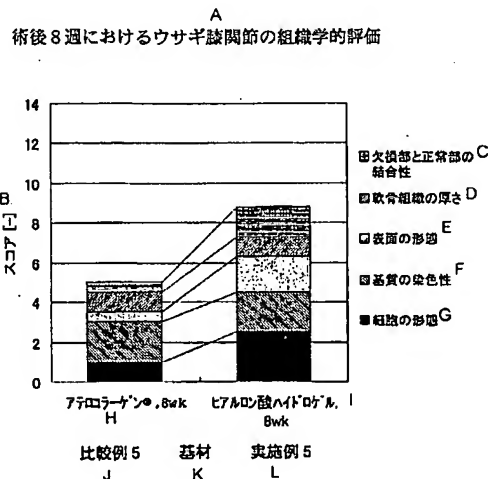
(10) 国際公開番号  
WO 2005/040224 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C08B 37/08, (72) 発明者; および  
A61L 27/00, A61K 31/728 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 北園 英一 (KITA-ZONO, Eiichi) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP). 兼子 博章 (KANEKO, Hiroaki) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP). 伊東 雅弥 (ITO, Masaya) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP). 福富 千秋 (FUKUTOMI, Chiaki) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP). 続 佐紀 (TSUZUKI, Saki) [JP/JP]; 〒180-0006 東京都武蔵野市中町3-4-9 Tokyo (JP). 鷺見 芳彦 (SUMI, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/016285
- (22) 国際出願日: 2004年10月27日 (27.10.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2003-368540  
2003年10月29日 (29.10.2003) JP  
特願 2004-205682 2004年7月13日 (13.07.2004) JP  
特願 2004-274775 2004年9月22日 (22.09.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka (JP).

/ 続葉有 /

(54) Title: HYALURONIC ACID COMPOUND, HYDROGEL THEREOF AND MATERIAL FOR TREATING JOINT

(54) 発明の名称: ヒアルロン酸化合物、そのハイドロゲルおよび関節治療用材料



- A... HISTOLOGICAL EVALUATION OF RABBIT KNEE JOINT 8 WEEKS AFTER SURGERY  
B... SCORE [-]  
C... BINDING OF DEFECT PART TO NORMAL PART  
D... CARTILAGE TISSUE THICKNESS  
E... SURFACE MORPHOLOGY  
F... STAINING OF MATRIX  
G... CELL MORPHOLOGY  
H... ATHEROCOLLAGEN®, 8 wk  
I... HYALURONIC ACID HYDROGEL, 8 wk  
J... COMPARATIVE EXAMPLE 5  
K... BASE MATERIAL  
L... EXAMPLE 5

(57) Abstract: It is intended to provide a hyaluronic acid compound which is a product of a reaction between hyaluronic acid and phosphatidylethanolamine. This compound is excellent in biocompatibility and biological safety and can be processed into a hydrogel or a molded article having a definite shape. By taking advantage of these properties, it is usable in treating knee joint or preventing postoperative tissue adhesion or as a skin moisturizing agent, etc.

(57) 要約: ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンの反応生成物であるヒアルロン酸化合物が提供される。この化合物は生体適合性、生体安全性を備え、しかもハイドロゲルや一定の形状を持つ成型体にすることが可能である。これらの性質を生かして膝関節治療、術後の組織癒着防止あるいは皮膚の保湿剤等に使用される。





(74) 代理人: 大島 正孝 (OHSHIMA, Masataka); 〒160-0004  
東京都 新宿区 四谷四丁目 3 番地 福屋ビル 大島特許  
事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## ヒアルロン酸化合物、そのハイドロゲルおよび関節治療用材料

## 5 技術分野

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンの反応生成物であるヒアルロン酸化合物、そのハイドロゲルおよび関節治療用材料に関する。

## 背景技術

- 10 軟骨は生体内で数少ない無血管系の組織の1つであり、元の組織に再建することは難しいとされている。外傷による軟骨欠損や離断性骨軟骨炎など限局した軟骨病変に基づく変形性関節症の発症を抑えるため、種々の治療法が試みられてきた。

- 自家軟骨細胞または骨髄細胞から間葉系幹細胞を採取して分化した軟骨細胞を、  
15 細胞のみ、あるいは培養基材 (Scaffold) に培養して軟骨欠損部に移植する自家軟骨細胞移植 (Autologous Chondrocytes Implantation; ACI) が試みられている (N Engl J Med. 331, 889-95 (1994)、J Bone Joint Surg Am. 76, 579-92 (1994) および Artificial Organs. 25, 172-179 (2001) 参照)。  
20

- また、自家軟骨細胞を生体外で培養する際に、より生体内環境に近いとされる3次元培養が積極的に試みられており、培養基材としては、コラーゲン、アルギン酸、フィブリンなど体内で安全と認められている材料が用いられている。そのうちコラーゲンについては、アテロコラーゲンをを用いた手法を越智らが開発し、  
25 臨床試験が始まっている (特開2001-293081号公報参照)。

しかし、コラーゲンは生体吸収性は示すものの、抗原性を完全に除去することは困難であり、また未知のウィルス感染などの危険性を否定することが出来ないなどの課題がある。

- これに対し、ヒアルロン酸は関節軟骨を形成する細胞外基質の構成成分であり、軟骨との親和性が高い。さらにヒアルロン酸は動物由来の原料を含まない発酵法で生成することが可能であるため、コラーゲンとは異なり未知のウィルス感染などの危険性は低い。そこで最近では、再生医療においてヒアルロン酸を利用した
- 5 膝軟骨損傷治療の検討が行われている。

- 米国特許第5939323号明細書、J. Biomed. Mater. Res. 42, 172-81 (1998)、J. Biomed. Mater. Res. 46, 337-46 (1999) およびJ. Orthop. Res. 18, 773-780 (2000) には、ベンジルエステル化ヒアルロン酸が開示されている。
- 10 また、特開平7-97401号公報には、ビスエポキシド架橋ヒアルロン酸が開示されている。さらに、米国特許第4582865号明細書および米国特許第4605691号明細書にはジビニルスルホン架橋ヒアルロン酸が開示され、特開昭60-130601号公報にはホルムアルデヒド架橋ヒアルロン酸が開示され、特開昭60-130601号公報にはホルムアルデヒド架橋ヒアルロン酸が
- 15 開示されている。その他ヒドラジド架橋ヒアルロン酸も知られている。

- しかし、いずれの場合もヒアルロン酸の生体吸収性を改善するために架橋剤を使用しているが、これらの架橋剤が非生体吸収性物質であるため安全性が懸念されており、安全性に優れた関節軟骨治療用材料が求められている。ちなみにここで言う“架橋”とは、共有結合からなる化学架橋以外に、静電相互作用によるイ
- 20 オン架橋、ファンデルワールスカ、疎水性相互作用による物理架橋を指す。

#### 発明の開示

本発明の目的は、生体適用性に優れ且つ安全なヒアルロン酸化合物を提供することにある。

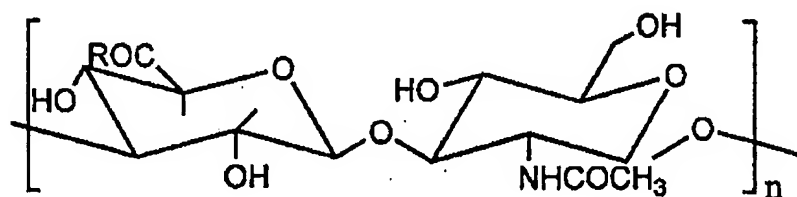
- 25 本発明の目的は、生体内において荷重のかかる部位においても使用可能な程の十分な強度を示すハイドロゲルを与えるヒアルロン酸化合物を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は水性媒体に不溶性の、上記ヒアルロン酸化合物からなる成型体を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、本発明の上記ヒアルロン酸化合物からなる関節治療用材料を提供することにある。

5 本発明のさらに他の目的および利点は以下の説明から明らかになる。

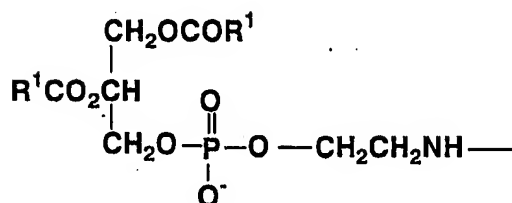
本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第1に、  
下記式(1)



... (1)

ここで、Rは下記式(1) - a

10



... (1) - a

で表わされる基、-OHまたは-ONaであり、

R<sup>1</sup>は炭素数10~28のアルキル基またはアルケニル基でありそしてnは50

15 ~50,000の数である、但しRの1~100%が上記式(1) - aで表わされる基であるものとする、

で表わされる、ヒアルロン酸化合物によって達成される。

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第2に、

本発明の上記ヒアルロン酸化合物からなるハイドロゲルによって達成される。

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第3に、  
本発明の上記ヒアルロン酸化合物の成型体によって達成される。

また、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第4に、  
本発明の上記ヒアルロン酸化合物からなる関節治療用材料によって達成される。

5

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例5および比較例5における、術後8週におけるウサギ膝関節の組織学的評価の対比である。

#### 発明の好ましい実施形態

- 10 本発明のヒアルロン酸化合物は、上記式(I)で表わされる。上記式(I)中、Rは式(I)-aで表わされるホスファチジルエタノールアミノ基であるか、-OHまたは-ONaである。但し、Rの1~100%がホスファチジルエタノールアミノ基である必要がある。ホスファチジルエタノールアミノ基がRの1%未満であると、本発明の目的が達成されない。Rは炭素数10~28、好ましくは
- 15 炭素数14~20のアルキル基またはアルケニル基であり、そしてnは50~50,000、好ましくは300~30,000、さらに好ましくは1,000~10,000である。

- Rの炭素数10~28のアルキル基としては、例えばデシル、ウンデシル、ラウリル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、ステアリル、エイコサニルを挙げることができる。また、炭素数10~28
- 20 のアルケニル基としては、例示した上記アルキル基に対応する、1~3個の炭素-炭素不飽和結合を有するアルケニル基例えばオレイル基を挙げることができる。

上記式(I)で表わされる化合物として、式(I)-a中の2つの基 $R^1CO$ -がオレオイル基であるものが好ましい。

- 25 上記式(I)で表わされるヒアルロン酸化合物は、例えばヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンとを反応させることによって製造することができる。

ヒアルロン酸としては、例えば動物組織から抽出したもの、または発酵法で製造したもののどちらでも使用できる。発酵法で使用される菌株としてはストレプト

コッカス属のヒアルロン酸生産能を有する微生物であり、ストレプトコッカス・  
エクイ FM-100 (特開昭 63-123392 号公報)、ストレプトコッカス・エ  
クイ FM-300 (特開平 2-234689 号公報) が知られている。これらの変異  
株を用いて培養、精製されたものも用いることができる。またヒアルロン酸の分  
子量は、約  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  が好ましい。なおここでいうヒアルロン酸には、  
5 そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩も包含され  
る。

さらに、ホスファチジルエタノールアミンとしては動物組織から抽出したもの、  
または合成して製造したものどちらでも使用できる。ホスファチジルエタノール  
10 アミンとしては、例えばジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリス  
トイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタ  
ノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドイ  
ルホスファチジルエタノールアミン、ジベヘノイルホスファチジルエタノールア  
ミン、ジリグノセロイルホスファチジルエタノールアミン、ジセロチオイルホス  
15 ファチジルエタノールアミン、ジモンタノイルホスファチジルエタノールアミン、  
ジラウロオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストオレオイルホ  
スファチジルエタノールアミン、シパルミトイルホスファチジルエタノールアミ  
ン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジネルボノイルホスファチ  
ジルエタノールアミン、ジキメノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノ  
20 レノイルホスファチジルエタノールアミン、ジヒラゴノイルホスファチジルエタ  
ノールアミン、ジアラキドノイルホスファチジルエタノールアミン、ジドコサヘ  
キサエノイルホスファチジルエタノールアミンを挙げることができる。その中で  
も、溶解性の面からジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

ホスファチジルエタノールアミンは、生体に安全な物質であり、本発明のヒア  
25 ルロン酸化合物としてヒアルロン酸を水素結合あるいは疎水性相互作用を利用し  
た物理架橋等により架橋を促進する。そのため、本発明のヒアルロン酸化合物は、  
これらの架橋により後述するハイドロゲルや不溶性成型体に形成することができ  
る。

ホスファチジルエタノールアミンの使用量は、ヒアルロン酸のカルボキシル基 100 当量に対し、1~100 当量であることが好ましい。1 当量より少ないと生成するヒアルロン酸化合物がハイドロゲルを形成しない。また、50 当量より多いと、生成するヒアルロン酸化合物の疎水性が高くなり不溶物が発生し、ハイドロゲルを形成し難くなり、特に 51 当量以上の使用量では水性媒体に対し十分な不溶性を示すようになる。ここで水性媒体とは、水、生理食塩水、緩衝液およびアルコールなど有機溶媒を含有する水溶液を意味し、また不溶性とは、ある一定期間ヒアルロン酸化合物が生体内に滞留し、その後は徐々に分解が進み、最終的には生体内に吸収されることを意味すると理解されるべきである。

- 10 動物例えば人間の膝関節の如き荷重のかかる生体膝関節部位に化合物を注入した際 200 Pa 以下では形状を維持することが困難であるのに対し、本発明のヒアルロン酸化合物からなるハイドロゲルは 200 Pa 以上の高弾性率を有するので、膝軟骨損傷治療用の材料として有用である。

本発明のヒアルロン酸化合物が水性媒体に、十分な不溶性を示すときには、これを成型体例えばスポンジの如き多孔体、不織布、フィルム等の形状に成形することができる。また、本発明のヒアルロン酸化合物が水性媒体に不溶性であっても体内に成型体を埋入した際に例えば 2~3 週間後、体液により膨潤してゲルに変換することも可能である。

- 20 成型体を製造する方法としては、例えば凍結乾燥法、乾式製膜、湿式製膜、凝固紡糸、スパンボンド法、メルトブロー法、フラッシュ紡糸法などが挙げられる。

これらの成型体は、例えば一定の形状を持つ成型体として用いて軟骨を修復することを必要とする用途、とくに高い滞留性が求められる用途、例えば関節治療、術後組織の癒着防止剤あるいは皮膚の保湿剤等に使用することができる。

- 25 本発明のヒアルロン酸化合物は、上記の如く軟骨修復能力を有する関節治療用材料として有利に使用することができる。

## 実施例

以下の実施例により本発明の詳細をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

以下の実施例1～4に使用したヒアルロン酸ナトリウムはストレプトコッカス属由来の平均分子量が1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムであり、これは $n=3,500$ に相当する。その他の試薬については、テトラヒドロフラン、0.1M HCl、0.1M NaOH、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC)、1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)、L-leucine methyl ester hydrochlorideは、和光純薬工業(株)、L- $\alpha$ -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (COATSOME ME-8181)は日本油脂(株)、3%アテロコラーゲンは高研(株)のものを使用した。

#### 実施例1

L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン110mg (0.000033mol) (ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し10当量)を、テトラヒドロフラン/水=1/1 (v/v) 200mlに溶解した。この溶液に、ヒアルロン酸ナトリウム500mgを加え、0.1M HCl/0.1M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 30mg (0.000033mol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 25mg (0.000033mol)をテトラヒドロフラン/水=1/1の水溶液10mlに溶解し反応系に添加し、終夜攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。確認は $^1\text{H}$ NMR (日本電子 JNM-alpha400)により行い、目的物の生成を確認した。

この凍結乾燥品30mgをイオン交換水970mgに溶解し、濃度3wt%のハイドロゲルを調整した。このハイドロゲルの複素弾性率及びズリ降伏応力を調べるために、Rheometer RFIII, SRV (TA Instrument)を使用し、37℃で測定を行った。その結果を表1に示す。ここでいう、



複素弾性率とは弾性体の応力とひずみの比を表す定数であり、ズリ降伏応力とはズリ応力を懸けた際、ゲルの構造が維持される最大応力を示す。

#### 実施例 2

L- $\alpha$ -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 440mg (0.00012mol) (ヒアルロン酸のカルボキシル基 100 当量に対し 40 当量)、  
1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 120mg (0.000132mol)  
1-hydroxybenzo-triazole (HOBt) 100mg (0.000132mol) を用いた以外は、実施例 1 と同様に行った。結果を表 1 に示す。

#### 比較例 1

ヒアルロン酸ナトリウム 50mg にイオン交換水 5ml を加え攪拌を行い、ハイドロゲルを得た。物性評価については、実施例 1 と同様。結果を表 1 に示す。

#### 比較例 2

米国特許第 4,937,270 号明細書を参考に追試実験を行った。詳細は以下の通りである。

ヒアルロン酸ナトリウム 400mg を水 40ml に溶解し、0.1M HCl により pH を 4.75 に調整した。

1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 153mg (0.80mmol)、L-leucine methyl ester hydrochloride 182mg (1.0mmol) を添加し、5 時間攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。物性評価については、実施例 1 と同様。結果を表 1 に示す。

#### 比較例 3

アテロコラーゲンを使用した以外は、実施例 1 と同様の条件でアテロコラーゲンを測定した。結果を表 1 に示す。

表 1

	材料	複素弾性率(Pa)	スリ降伏応力(Pa)
実施例1	ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレイ ルホスファチジルエタノールアミン (10mol%)	421	1, 083
実施例2	ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレイ ルホスファチジルエタノールアミン (40mol%)	902	1, 734
比較例1	ヒアルロン酸ナトリウム	5	18
比較例2	架橋ヒアルロン酸	513	515
比較例3	アテロコラーゲン	293	919

- 5 表1より、ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミンは、ヒアルロン酸ナトリウム、アテロコラーゲンと比較し複素弾性率、降伏  
ズリ応力いずれも優れていることが明らかである。また、架橋ヒアルロン酸と比  
較した場合においても、同等またはそれ以上の機械特性を示すことが分かる。

#### 実施例 3

- 10 ヒアルロン酸ナトリウム100mgをテトラヒドロフラン/水=1/1 (v/  
v) の水溶液40mlに溶解した。この溶液に、L- $\alpha$ -ジオレイルホスファ  
チジルエタノールアミン154mg (0.00021mol) (ヒアルロン酸の  
カルボキシル基100当量に対し70当量)を加え、0.1M HCl/0.1  
M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-  
15 (dimethylamino) propyl]-carbodiimide  
(EDC) 42mg (0.000231mol)、1-hydroxybenz  
otriazole (HOBt) 35mg (0.000231mol)をテト  
ラヒドロフラン/水=1/1 (v/v) 10mlに溶解し反応系に添加した。そ  
の際0.1M NaOHを加え反応系をpH 6.8に保持した。その後終夜攪拌  
20 を行い、攪拌後透析を3日間行い凍結乾燥し目的物(スポンジ)を得た。確認は

$^1\text{H}$ NMR (日本電子 JNM- $\alpha$ 400) により行い、目的物の生成を確認した。

- 以下の方法により溶解性テストを行った。得られた目的物 20mg をリン酸緩衝生理食塩水 5ml 中に浸漬し、室温静置状態での溶解性について 4 週間テスト
- 5      を行い、目視で確認を行った。溶解性テストの結果を表 2 に示す。

#### 実施例 4

- L- $\alpha$ -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 223mg (0.0003mol) (ヒアルロン酸のカルボキシル基 100 当量に対し 100 当量)、
- 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-
- 10 carbodiimide (EDC) 60mg (0.00033mol) 1-hydroxybenzo-triazole (HOBt) 50mg (0.00033mol) とした以外は、実施例 1 と同様に目的物 (スポンジ) を得た。溶解性テストの結果を表 2 に示す。

#### 比較例 4

- 15      ヒアルロン酸ナトリウム 20mg をリン酸緩衝生理食塩水 5ml 中に浸漬し、室温静置状態での溶解性について 4 週間テストを行い、目視で確認を行った。結果を表 2 に示す。

表 2

	L- $\alpha$ -ジオレオイル ホスファチジルエタノ ールアミンの含有量 (当量) <sup>1)</sup>	1 日	1 週間	2 週間	4 週間
実施例 3	7 0	○	○	○	○
実施例 4	1 0 0	○	○	○	○
比較例 4	0	×	×	×	×

○：溶解していない、△：一部溶解、×：完全溶解

5 1) ヒアルロン酸のカルボキシル基 1 0 0 当量に対する量

表 2 より、ヒアルロン酸-L- $\alpha$ -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (含有量：7 0、1 0 0 当量) は、ヒアルロン酸ナトリウムと比較し、水性液体に対するヒアルロン酸の不溶化が進んでいることが明らかである。

- 10 次の実施例 5 に使用した消毒用エタノール、1 0 % 中性緩衝ホルマリン溶液、サフラニン O 溶液は、和光純薬工業 (株) の市販品、Fast Green F CF は、Polyscience (株) の市販品、Ethylenediamine-N, N, N', N' -tetraacetic acid, tetrasodium salt, tetrahydrate (以下 EDTA) は同仁化学
- 15 研究所 (株) の市販品、ペントバルビタール (以下ネンブタール) は大日本製薬 (株) の市販品、1 % キシロカインはアストラゼネカ (株) の市販品、結晶ペニシリン G カリウム (以下ペニシリン) は萬有製薬 (株) の市販品、ヨードチンキは吉田製薬 (株) の市販品である。また、実施例 5 に使用したニュージーランド白色家兎 (以下 NZW ウサギ) は雄性であり、日本 SLC (株) より購入し
- 20 て体重 3. 0 ~ 3. 5 k g になるまでゲージにて通常飼育を行った。手術後の週齢は 2 4 ~ 2 8 週齢であった。

実施例 5

実施例1で調整した濃度3wt%のヒアルロン酸ハイドロゲルの生物学的評価を以下の方法により行った。通常飼育したNZWウサギの耳介静脈にペントバルビタールを投与し、全身麻酔下で以下の手術を施した。両側の後肢膝関節周辺部を剃毛し、エタノール消毒をした後、キシロカインを局所に数回分けて筋肉内投与した。膝関節内側を切開し、膝蓋骨を脱臼させることにより大腿骨膝蓋溝を露出させた。内側側副靱帯から5mmほど上部の滑車溝部分に、手術用ドリルで内径5mm、深さ5mmの円筒形の欠損部を作製することによって、膝関節軟骨全層を欠損させた。そこに欠損部に上記で得られたハイドロゲルを埋入したのち、膝蓋骨を元の位置に戻して筋肉を手術用縫合した。感染防止のためにペニシリンを患部に滴下したのち、皮膚を縫合した。最後にヨードチンキで消毒し、ゲージに戻して通常の飼育を行った。術後8週間目に屠殺して欠損部分を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬、固定させ、組織学的評価に供した。固定した組織を、脱脂、EDTA脱灰した後、パラフィンに包埋し、欠損部の中心部近傍を矢状面に薄切して、標本作製した。作製した標本にサフラニンO染色を施し、以下の項目についてスコア化することにより組織学的な評価を行った。

組織学的評価に用いたスコアグレードは、Wakitani S et al., J Bone Joint Surg Am. 76, 579-92 (1994) の変法である Makino T et al., Kobe J Med Sci. 48: 97-104 (2002) に従って実施した。表3に組織学的評価をする際に用いた項目と得点を示す。

全体の合計は14点であり、項目によって3～5段階で評価する。組織の修復度が高いほど、すなわち、正常組織に近い修復を示すほど、14点に近づくことになる。すなわち、項目は、修復された組織の形態（0点から4点）、基質の染色性（0点から3点）、表面の状態（0点から3点）、軟骨組織の厚さ（0点から2点）、非欠損部との結合度（0点から2点）、についてであり、本法では正常組織に近いほど得点が高くなる。

術後8週目に欠損部位を摘出して組織学的評価を行った結果を図1に示す。術後8週間目において修復された軟骨組織は、ほとんどが硝子軟骨様を呈しており、

基質が良好に産生をしている様子が観察された。また、正常部との結合も良好であり、組織の連続性を認めた。

#### 比較例 5

- 実施例 5 と同様に、大腿骨滑車溝に欠損部分を作製したのち、アテロコラーゲンゲル（登録商標）（I 型、（株）高研）を埋入して整復し、術後 8 週目に欠損部分を摘出して組織学的評価を行った結果を図 1 に示す。

実施例 5 と比較すると、基質の染色性は他の条件との差が認められないものの、表面は平滑になっておらず、軟骨下骨が全く再建されていなかった。

表3 軟骨欠損に対する組織学的評価

A. 細胞の形態	4 硝子軟骨のみで構成、正常 3 大半が硝子軟骨で修復 1 ほとんどが非軟骨組織で修復 0 軟骨組織が全くない
B. サフラニンOによる基質の染色性	3 (正常部位と比較して) 同等の染色性 2 少し低下 1 かなり低下 0 染色性なし
C. 表面の形態*	3 平滑 (>3/4) 2 中程度 (1/2 - 3/4) 1 でこぼこ (1/4 - 1/2) 0 ひどくでこぼこ (<1/4)
D. 軟骨組織の厚さ**	2 >2/3 1 1/3 - 2/3 0 <1/3
E. 正常部分の近傍の軟骨に対する修復部分の一例	2 両端とも一体化 1 一端が一体化 0 両端とも一体化していない
合計 A-E	0-14

\* 欠損部分での全体に対する平滑な部分の割合

5 \*\* 修復部の正常部位と比較した平均の厚さ

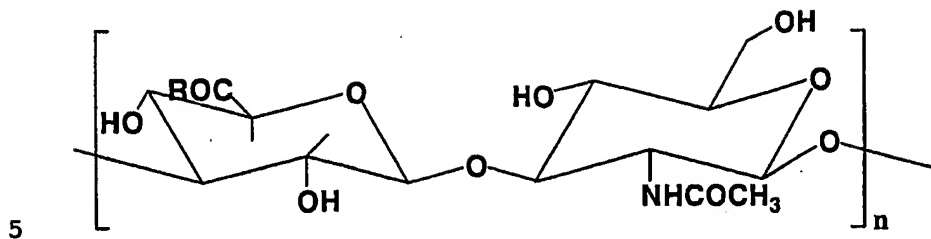
以上の結果より、実施例 5 は、基質の染色性と修復した軟骨組織の厚さにおいては比較例 5 と同等であるが、表面の状態と正常組織との組織学的な連続性については正常組織により近い修復であり、全体として良好な修復能を示すことが確認できた。

- 5      これより本発明のヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンジオレオイルからなるヒアルロン酸化合物は比較例（アテロコラーゲン）よりも軟骨治療用材料として優れていることが分かった。



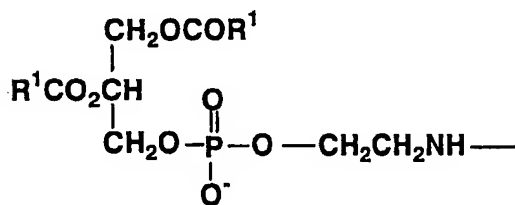
## 請求の範囲

## 1. 下記式 (1)



ここで、Rは下記式 (1) - a

... (1)



... (1) - a

10 で表わされる基、-OHまたは-ONaであり、R<sup>1</sup>は炭素数10～28のアルキル基またはアルケニル基でありそしてnは50～50,000の数である、但しRの1～100%が上記式 (1) - aで表わされる基であるものとする、で表わされる、ヒアルロン酸化合物。

2. nが300～30,000である請求項1に記載のヒアルロン酸化合物。

15

3. 式 (1) - aにおける2つの基R<sup>1</sup>CO-がいずれもオレオイル基である請求項1に記載のヒアルロン酸化合物。

4. 請求項1～3のいずれかに記載のヒアルロン酸化合物からなるハイドロゲル。

20

5. 請求項1～3のいずれかに記載のヒアルロン酸化合物の成型体。

6. 請求項 1～3 のいずれかに記載のヒアルロン酸化合物からなる関節治療用材料。

7. 軟骨修復能力を有する請求項 6 に記載の関節治療用材料。

5

8. 請求項 1 に記載のヒアルロン酸化合物の関節治療用材料としての使用。

1/i

図 1

術後 8 週におけるウサギ膝関節の組織学的評価

